

学校编码: 10384

分类号\_\_密级\_\_

学号: 32320131153393

UDC\_\_

厦门大学

硕 士 学 位 论 文

# 海洋贝类毒素 HIV-1 潜伏激活剂的筛选 和机制研究

Activation of Latent HIV-1 by Marine Shellfish Toxins

余 雕

指导教师姓名: 周 强 教授

专 业 名 称: 化学生物学

论文提交日期: 2016 年 4 月

论文答辩时间: 2016 年 5 月

学位授予日期:

答辩委员会主席: \_\_

评阅人: \_\_

2016 年 月

# 厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为( )课题(组)的研究成果,获得( )课题(组)经费或实验室的资助,在( )实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人(签名):

年 月 日

# 厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

（        ） 1. 经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，  
于        年        月        日解密，解密后适用上述授权。

（        ） 2. 不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年        月        日

# 目录

英文缩略词语对照表 .....	IV
摘要.....	VII
Abstract .....	VIII
<b>第一章 前言 .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 艾滋病简介及潜伏期形成 .....</b>	<b>1</b>
1.1.1 HIV 的发现 .....	1
1.1.2 艾滋病的治疗.....	2
1.1.3 HIV 的潜伏感染 .....	3
1.1.4 抗 HIV 治疗新策略“Shock and Kill” .....	4
<b>1.2 正性转录延伸因子 b (Positive transcriptional elongation factor b ) .....</b>	<b>6</b>
1.2.1 P-TEFb 生物学功能.....	6
1.2.2 P-TEFb 的转录调控机制.....	7
1.2.3 P-TEFb 在 HIV-1 病毒转录调控中的作用 .....	10
<b>1.3 含溴结构域蛋白 4(Bromodomain-containing protein 4,Brd4).....</b>	<b>11</b>
1.3.1 Brd4 与 BET 家族蛋白 .....	11
1.3.2 外界信号诱导 Brd4 应激活化促进转录.....	12
<b>1.4 海洋药物研发现状 .....</b>	<b>12</b>
1.4.1 海洋药物和海洋毒素.....	12
1.4.2 腹泻性贝毒.....	14
<b>1.5 SILAC 技术 .....</b>	<b>20</b>
1.5.1 SILAC 技术的基本原理 .....	20
1.5.2 SILAC 技术的优点 .....	20
1.5.3 应用 SILAC 研究蛋白质相互作用 .....	21
<b>1.6 本课题研究目的和意义 .....</b>	<b>22</b>
<b>第二章 实验材料与方法 .....</b>	<b>24</b>

<b>2.1 实验材料 .....</b>	<b>24</b>
2.1.1 细胞株、菌株、质粒.....	24
2.1.2 实验主要试剂.....	24
2.1.3 主要仪器和耗材.....	26
2.1.4 主要溶液配方.....	27
<b>2.2 实验方法 .....</b>	<b>33</b>
2.2.1 细胞培养.....	33
2.2.2 J-Lat A2 细胞药物处理及流式细胞仪分析 .....	33
2.2.3 Luciferase 荧光素酶实验.....	34
2.2.4 PEI 瞬时转染.....	34
2.2.5 全细胞裂解液制备.....	35
2.2.6 免疫共沉淀.....	36
2.2.7 免疫印记实验.....	36
2.2.8 Total RNA 提取及反转录为 mRNA .....	37
2.2.9 质粒转化.....	39
2.2.10 细胞的药物处理.....	40
2.2.11 细胞核蛋白抽提.....	40
2.2.12 核分级分离 (Nuclear fractionation) .....	41
2.2.13 溶液中酶解.....	41
2.2.14 除盐 (STAGE-TIP) .....	42
2.2.15 胶内酶解.....	43
<b>第三章 结果与讨论 .....</b>	<b>45</b>
<b>3.1 结果 .....</b>	<b>45</b>
3.1.1 海洋贝毒 OA 及其衍生物可诱导潜伏期 HIV-1 再激活 .....	45
3.1.2 OA 抑制 Tat 依赖的 HIV-1 转录.....	48
3.1.3 几种碱性磷酸酶抑制剂对 HIV-1 潜伏激活的比较 .....	50
3.1.4 OA 促使 7SK snRNP 解离 .....	53
3.1.5 OA 诱导 Brd4 的应激活化.....	55
3.1.6 OA 通过促进 Brd4 与 Tat 竞争性的结合 P-TEFb 抑制 Tat 依赖性	

的 HIV 转录 .....	59
3.1.7 SILAC 蛋白定量技术验证 OA 促进 HIV-1 转录 .....	60
3.2 讨论 .....	62
3.3 小结 .....	63
参考文献 .....	65
致谢 .....	71

## Catalogue

<b>Abbreviation.....</b>	<b>IV</b>
<b>Abstract in Chinese.....</b>	<b>VII</b>
<b>Abstract.....</b>	<b>VIII</b>
<b>Chapter I Forwords.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Introduction of AIDS and formation of HIV latency.....</b>	<b>1</b>
1.1.1 Discovery of HIV .....	1
1.1.2 Treatment of AIDS .....	2
1.1.3 Latent infection of HIV .....	3
1.1.4 A new treatment strategy of HIV-“Shock and Kill”.....	4
<b>1.2 Positive transcriptional elongation factor b .....</b>	<b>6</b>
1.2.1 Composition and function of P-TEFb.....	6
1.2.2 Transcriptional regulation mechanism of P-TEFb.....	7
1.2.3 The function of P-TEFb in transcriptional regulation of the HIV-1 virus.....	10
<b>1.3 Bromodomain-containing protein -Brd4 .....</b>	<b>11</b>
1.3.1 Brd4 and BET family protein .....	11
1.3.2 Stressed-activation of Brd4 to activate transcription .....	12
<b>1.4 The research progress of marine drugs .....</b>	<b>12</b>
1.4.1 Marine drugs and Marine toxin.....	12
1.4.2 Diarrhetic shellfish poisoning .....	14
<b>1.5 SILAC technology .....</b>	<b>20</b>
1.5.1 The basic principle of SILAC technology .....	20
1.5.2 Advantages of SILAC technology .....	20
1.5.3 Using SILAC to study the interaction between proteins .....	21
<b>1.6 Content and significance of this project.....</b>	<b>22</b>
<b>Chapter II Materials and methods.....</b>	<b>24</b>

<b>2.1 Materials .....</b>	<b>24</b>
2.1.1 Cell line, E.coli and Plasmids .....	24
2.1.2 Reagents.....	24
2.1.3 Appratus.....	26
2.1.4 Solution.....	27
<b>2.2 Methods.....</b>	<b>33</b>
2.2.1 Cell culture.....	33
2.2.2 Drug treatment on J-Lat A2 cell and flow cytometry .....	33
2.2.3 Luciferase assay .....	34
2.2.4 PEI transient transfection.....	34
2.2.5 Preparation of whole cell lysis .....	35
2.2.6 Co-immunoprecipitation purification .....	36
2.2.7 Western blot.....	36
2.2.8 Total RNA extraction and and reverse transcrip to mRNA.....	37
2.2.9 DNA transformation .....	39
2.2.10 Pharmacological induction.....	40
2.2.11 Nuclear extract preparation.....	40
2.2.12 Modified nuclear fractionation .....	41
2.2.14 In-solution digestion .....	41
2.2.15 Desalt (STAGE-TIP) .....	42
2.2.16 In-gel digestion .....	43
<b>Chapter III Result and Discussion.....</b>	<b>45</b>
<b>3.1 Result.....</b>	<b>45</b>
3.1.1 Marine shellfish poisoning of OA and it is derivatives can induce the reactivation of latent HIV-1 .....	45
3.1.2 OA inhibits tat-dependent HIV-1 transcription .....	48
3.1.3 Comparison of several phosphatase inhibitors to reactivation of latent HIV .....	50
3.1.4 OA releases active P-TEFb from 7SK snRNP.....	53



3.1.5 OA induces stressed-activation of Brd4 .....	55
3.1.6 OA inhibits tat-dependent HIV-1 transcription by promoting the competitive binding with P-TEFb of Brd4 and Tat .....	59
3.1.7 SILAC protein quantitative techniques to verify OA promotes HIV-1 transcription .....	60
<b>3.2 Discussion.....</b>	<b>62</b>
<b>3.3 Conclusion .....</b>	<b>63</b>
<b>References .....</b>	<b>65</b>
<b>Acknowledgement .....</b>	<b>71</b>

## 英文缩略词语对照表

Abbreviation	Full Name
7SK snRNP	7SK small nuclear ribonucleoprotein, HEXIM1/7SK/LARP7/MePCE/P-TEFb
AIDS	Acquired Immune Deficiency Syndrome
BD (I, II)	Bromodomain (I, II)
BET	Bromodomains and extraterminal
Brd4	Bromodomain-containing protein 4
Caly A	Calyculin A
CDK9	Cyclin dependent kinase 9
CsA	Cyclosporine A
CTD	C-terminal domain
DMEM	Dulbecco's modified of Eagle's medium
DSP	Diarrhetic shellfish poisoning
EGTA	Ethylene glycol bis(2-aminoethyl ether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid
FK506	Tacrolimus

---

HAART	Highly active antiretroviral therapy
HDAC	Histone deacetylase
HIV-1	Human immunodeficiency virus type 1
HMBA	Hexamethylene bisacetamide
HSF	High salt fraction
LSF	Low salt fraction
LTR	Long terminal repeats
MCLR	Microcystin LR
MePCE	Methylphosphate Capping Enzyme
NIFE	Nifedipine
NSL	Nuclear localization signal
NMWR	Morbidity and mortality weekly report
OA	Okadaic acid
P-TEFb	Positive transcriptional elongation factor b
PKC	Protein kinase C

---

PP2A	Protein phosphatases 2A
PP1	Protein phosphatases 1
PP2B/CaN	Protein phosphatase 2B/Calcineurin
Pol II	RNA polymerase II
SILAC	Stable isotope labeling by amino acids in cell culture
snRNP	Small nuclear ribonucleoprotein particle
TAR	Transacting-response
WHO	World Health Organization

---

## 摘要

高效抗逆转录病毒疗法(HAART)是目前治疗艾滋病最可靠的方法,HAART可以通过药物联用的方法有效的降低艾滋病感染者的死亡率,但由于 HIV 的潜伏感染,HAATR 疗法并不能将 HIV 病毒从体内完全清除,患者体内的 HIV 病毒潜伏库是彻底治愈艾滋病的巨大挑战。随着“Shock and Kill”的治疗新策略的提出,通过激活潜伏期 HIV 病毒库进而根除潜伏病毒,从而实现艾滋病的彻底根治。因此寻找高效低毒 HIV 潜伏激活剂具有重要的科学意义和应用价值。

本研究基于 J-Lat A2 等细胞筛选模型对四类海洋贝类毒素进行流式细胞仪筛选,发现大田软海绵酸(OA)及鳍藻毒素(DTX-1, DTX-2)对潜伏期 HIV-1 具有较好的再激活作用,且对潜伏期 HIV-1 的转录具有浓度及时间依赖性。同时,发现 OA 在稳定表达 HIV-1 LTR-Luciferase 报告基因的 NH1 细胞中也有明显的转录激活作用,但 OA 却抑制 Tat 依赖性的 HIV-1 的转录。以 OA 作为模型药物进行激活机制研究,主要结论有以下几点:(1)发现 OA 与其他四种磷酸酶特异性抑制剂具有不同的 HIV 潜伏激活活性;(2)OA 在低浓度下能够促使 7SK snRNP 的解离,使得更多的 P-TEFb 处于活化状态;(3)并且 OA 可以促进 Brd4 的应激活化,使更多的 Brd4 募集活化的 P-TEFb 至启动子区,两方面协同促进 HIV 的转录激活;(4)OA 抑制 Tat 依赖性的 HIV-1 的转录也与 OA 促进 Brd4 的应激活化有关。

本课题通过筛选多种海洋贝类毒素,发现软海绵酸及其类似物对潜伏期 HIV-1 具有激活作用,但却抑制 Tat 依赖性的 HIV-1 的转录,并通过分子生物学实验探明 OA 激活潜伏期 HIV-1 但抑制 Tat 依赖性的 HIV-1 转录的分子机制,为 HIV 治疗新药物的研发提供了新视角。

关键词: 海洋毒素; 软海绵酸; HIV-1 潜伏激活剂; Brd4

## Abstract

Highly active antiretroviral therapy (HAART) is the most reliable strategy for treatment of AIDS at present. HAART can effectively reduce the mortality rate of AIDS in the infected persons by drug combination method. However, due to the latent infection of the HIV, HAART therapy is not able to completely remove the virus from the body. HIV latency is a huge challenge for complete cure of AIDS. Recently, new strategy for AIDS treatment, named "Shock and Kill", could reactivate the latent HIV-1 and subsequently eradicate the latent virus. Therefore, it is of great scientific significance and application value to discovery new HIV latent activators with high efficiency and low toxicity.

In this study, five types of marine shellfish toxins were screened by flow cytometry based on A2 J-Lat and other cell screening models. It is found that okadaic acid (OA) and dinophysistoxin-1 (DTX-1, DTX-2) can reactivate HIV-1 latency. NH1 cell is a cell type of stably expressing HIV-1 LTR-Luciferase reporter gene, and it is found that OA also show the significant activity of transcription in NH1 cells, but OA inhibits the transcription of tat-dependent HIV-1 genes. OA as a model drug was used to study the activation mechanism and the main conclusions were summarized as follow: (1) OA and other four kinds of phosphatase inhibitors have different activities of latent HIV reactivations; (2) OA can promote the dissociation of 7SK snRNP at low concentration and lead more P-TEFb in the active state; (3) OA can promote the Brd4 stress-activated release, and more Brd4 proteins were available for recruitment of P-TEFb to the promoter region for the transcription activation of HIV-1; (4) The inhibition of tat-dependent transcription of HIV-1 by OA is mainly due to the Brd4 stress-activated release.

In this research, a variety of marine shellfish toxins have been successfully screened for discovery of new activators for HIV latency. It is found that okadaic acid and its analogs can reactivate HIV-1 latency at low concentrations. The molecular

mechanisms of OA were systematically investigated through molecular biology experiments. This research might provide a new perspective for the research and development of drugs for the treatment of HIV.

Keywords: Marine toxin ;Okadaic Acid ;HIV-1 Latent Activator; Brd4

厦门大学博硕士论文摘要库

## 第一章 前言

艾滋病，即获得性免疫缺陷综合症（Acquired Immune Deficiency Syndrome, AIDS），于 1981 年 6 月，在美国疾病控制与预防中心发现全球首例艾滋病病毒感染者，并于 1982 年 9 月正式命名为 AIDS。20 世纪艾滋病毒从非洲地区开始蔓延至全球，成为全球性的流行病<sup>[1]</sup>。据世界卫生组织（WHO）最新统计，自 1981 年发现第一例艾滋病案例以来，已造成超过 3,400 万人的死亡，2014 年底全球感染人数达到 3690 万人，仅 2014 年新增感染者 200 多万人次。艾滋病已成为严重威胁人类健康的流行病之一，一方面艾滋病的传播及蔓延不但严重威胁人类健康，而且还会带来如家庭贫困、社会歧视、医疗负担、孤儿人数增加等一系列负面问题，对地区及国家的社会经济发展产生严重影响；另一方面直至现在，仍未有任何药物证实能够彻底治愈艾滋病，虽然抗逆转录病毒药物可以控制 HIV 病毒并防止病毒携带者传播病毒，但是花费巨大，仅少部分家庭有能力负担，并且抗逆转录疗法仅适用于早期感染患者。因此艾滋病已是全世界疾病监测的重要指标之一，各国政府也积极通过各种手段，教育宣传使人们增加对艾滋病的认识及预防手段，艾滋病的彻底根治是人类急待解决的医学难题之一。

### 1.1 艾滋病简介及潜伏期形成

#### 1.1.1 HIV 的发现

20 世纪 80 年代初，自首例艾滋病患者发现之后，人们注意到男同性恋者成为一种免疫系统疾病的易感人群，这些患者因为免疫系统非常糟糕，易患卡波西肉瘤和卡氏肺囊虫肺炎等疾病，但当时人们对这种病一无所知。最初人们认为这是男同性恋才患的疾病，但是后来随着越来越多的人患病，患病人群扩大，才逐渐认识到这种病的一些特征，这种疾病临床病症不统一，但都有着同一种致病原因，即免疫系统受到破坏。1982 年 9 月 15 日美国疾病与控制中心正式将这种疾病命名为获得性免疫缺陷综合征（Acquired



Degree papers are in the “[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)”.

Fulltexts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to [etd@xmu.edu.cn](mailto:etd@xmu.edu.cn) for delivery details.